

⑫ **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

⑰ Anmeldenummer: **88108609.4**

⑸ Int. Cl.<sup>4</sup> **C12N 15/00 , A61K 39/104 ,  
C12Q 1/68 , G01N 33/577**

⑳ Anmeldetag: **30.05.88**

Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat: ES.

⑬ Priorität: **03.06.87 DE 3718591**

⑬ Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**04.01.89 Patentblatt 89/01**

⑭ Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE ES FR GB IT LI LU NL SE**

⑴ Anmelder: **BEHRINGWERKE**  
**Aktiengesellschaft**  
**Postfach 1140**  
**D-3550 Marburg 1(DE)**

⑵ Erfinder: **Domdey, Horst, Dr.**  
**Fasanenweg 6**  
**D-8027 Neuried(DE)**  
Erfinder: **Lottspeich, Friedrich, Dr.**  
**Drosselweg 1**  
**D-8027 Neuried(DE)**  
Erfinder: **von Specht, Bernd-Ulrich, Prof. Dr.**  
**Am Waldweg**  
**D-8193 Ambach(DE)**  
Erfinder: **Duchene, Michael, Dr.**  
**Gabelsbergerstrasse 59**  
**D-8000 München 2(DE)**

⑶ Vertreter: **Meyer-Dulheuer, Karl-Hermann, Dr.**  
**et al**  
**HOECHST Aktiengesellschaft Zentrale**  
**Patentabteilung Postfach 80 03 20**  
**D-6230 Frankfurt/Main 80(DE)**

⑤ **Äusseres Membranprotein F von Pseudomonas aeruginosa.**

⑥ Das Gen für das äussere Membranprotein F (OMPF) von *Pseudomonas aeruginosa* wurde isoliert, sequenziert und exprimiert. Dadurch wird OMPF und immunogene Teilsequenzen in der Menge und Reinheit gewonnen, die für einen Einsatz zur Herstellung Impfstoffen erforderlich ist.

**EP 0 297 291 A2**

## Äußeres Membranprotein F von *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* ist ein ubiquitär vorkommender Mikroorganismus, der in der Humanmedizin als "Problemkeim" bekannt ist. Er befällt in erster Linie geschwächte Patienten und ist häufig durch Antibiotikatherapie nur schwer zu bekämpfen. Besonders gefährdet sind deshalb Patienten auf Intensivstationen und Querschnittsgelähmte sowie Menschen, die Verbrennungen erlitten oder der Gefahr von Verbrennungen ausgesetzt sind, wie Feuerwehrleute und Stahlarbeiter.

W.A. Woodruff et al., J. Bacteriol. 167 (1986) 473-479 beschreiben die Expression des äußeren Membranproteins F (Outer Membrane Protein F, OMPF, Porin F) in *E. coli*, wobei ein nicht näher definierter Stamm *P. aeruginosa* PAO1 als Ausgangsstamm diente. Die klonierten DNA-Sequenzen sind nur durch sehr grobe Restriktionskarten charakterisiert: es sind weder DNA-Sequenzen noch Aminosäure-Teilsequenzen angegeben und es wird auch auf keine Hinterlegung des klonierten Materials bei einer anerkannten Hinterlegungsstelle verwiesen.

Der Erfindung liegt die komplette Charakterisierung des Gens für OMPF aus *P. aeruginosa*, Serotyp 6, ATCC 33354, zugrunde. Die DNA-Sequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sind in der Tabelle wiedergegeben, wobei die Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode unter den betreffenden Tripletts angeordnet ist und das Signalpeptid durch kursive Buchstaben hervorgehoben ist.

Hierzu wurden aus dem genannten Stamm die Proteine der äußeren Membran gewonnen und daraus mittels HPLC das OMPF angereichert. Der Aminoterminus und durch Spaltung mit Trypsin erhaltene Proteinfragmente wurden ansequenziert. Aus verschiedenen dieser Oligopeptide wurden dafür kodierende DNA-Sequenzen abgeleitet und diese Oligodesoxynukleotide chemisch synthetisiert. Weiterhin wurde aus dem Stamm genomische DNA isoliert, gereinigt und mit dem Restriktionsenzym Sau3A partiell verdaut. DNA-Fragmente von etwa 15 bis 20 kb wurden angereichert und in den  $\lambda$ -Phagen EMBL 3 (A.-M. Frischaut et al., J. Mol. Biol. 170 (1983) 827-842; R.W. Hendrix et al. (Eds.), Lambda II, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1983), kloniert. Die so erhaltene Genbank wurde mit den synthetisierten Oligodesoxynukleotiden auf komplementäre Sequenzen abgesucht. Aus einem der gefundenen positiv reagierenden Phagen-Klone wurde das Gen für OMPF auf einem 15 kb-Fragment gefunden. Auf diesem Fragment und auf weiteren gefundenen Fragmenten konnte das Gen auf einem 2.5 kb PstI-Fragment einge-

grenzt werden. Es zeigte sich jedoch, daß dieses Fragment nicht in einen "high copy number"-Vektor kloniert werden konnte, da das Genprodukt offensichtlich für die Wirtszelle toxisch ist. Das Gen wurde deshalb in zwei überlappenden Teilstücken mit einem Überlappungsbereich von etwa 500 bp subkloniert. Aus den beiden Subklonen wurde die DNA-Sequenz des OMPF-Gens und der angrenzenden Bereiche bestimmt. Beide DNA-Stränge des Gens wurden vollständig (nach der Methode von Sanger) sequenziert. Aus der so erhaltenen DNA-Sequenz wurde die entsprechende Aminosäuresequenz abgeleitet. Die Aminosäuresequenzen aller Oligopeptide, die durch tryptische Spaltung des Proteins erhalten worden waren, konnten eindeutig zugeordnet werden. Das 5'-Ende der OMPF-mRNA wurde durch S1-Analyse und reverse Transkription der mRNA ermittelt.

Die Charakterisierung des Gens erlaubt nunmehr die Herstellung von OMPF und immunogenen Teilsequenzen dieses Proteins in der Menge und Reinheit, die für einen Einsatz zur Herstellung von Impfstoffen erforderlich ist.

Die Erfindung betrifft somit das OMPF mit der Aminosäuresequenz gemäß Tabelle, die dafür kodierende DNA, deren Protein kodierender Strang in der Tabelle dargestellt ist, immunogene Teilsequenzen von OMPF, mit OMPF und immunogenen Teilsequenzen dieses Proteins gewonnene polyklonale und monoklonale Antikörper und die entsprechenden Seren sowie Diagnostika, die solche Antikörper oder entsprechende Nukleotidsequenzen enthalten und Diagnostizierverfahren unter Verwendung solcher Diagnostika.

Darüber hinaus eröffnet die Erfindung einen Weg zur passiven Immunisierung mit humanen monoklonalen Antikörpern. Die Erfindung betrifft deshalb auch die Verwendung von erfindungsgemäß gewonnenen Antigenen zur Induzierung von Lymphozyten zur Produktion entsprechender monoklonaler Antikörper bzw. zum Testen von Lymphozyten auf die Produktion solcher Antikörper.

Die Aufarbeitung, Reinigung, Immunisierung und Gewinnung der Seren bzw. Antikörper kann nach an sich bekannten Methoden erfolgen. Verwiesen sei beispielsweise auf M.E. Gilleland et al., Infection and Immunity 44 No. 1 (Apr. 1984) 49-54; R.E.W. Hancock et al., J. Infectious Diseases 149 No. 2 (Feb. 1984) 220-226; S. Sawada et al., J. Infectious Diseases 150 No. 4 (Oct. 1984) 570-576.

Die Erfindung wird in den folgenden Beispielen näher erläutert. Teile und Prozentangaben beziehen sich auf das Gewicht, wenn keine anderen Angaben gemacht sind.

**Beispiel 1:****Gewinnung von OMPF und tryptischer Fragmente**

Die äußeren Membranproteine von *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 33354 werden nach der Methode von Mizuno und Kageyama (J. Biochem. 86, 979-989, 1979) isoliert. Die Bakterienkulturen werden in der spät-logarithmischen Wachstumsphase geerntet, in 10 mM Na-Phosphat (pH 7,2; "Aufschlußpuffer") suspendiert und mit Glasperlen im Homogenisator (Waring-Blender) bei 4°C 5 min aufgeschlossen. Die Zellwände werden durch 60-minütige Zentrifugation bei 100 000 g bei 4°C pelletiert und noch zweimal mit dem Aufschlußpuffer gewaschen. Pro 150 g Naßgewicht *Pseudomonas* werden zum Pellet 400 ml SDS-Puffer (2 % SDS, 10 % Glycerin, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8) zugegeben und bei 30°C 60 min gerührt. Danach wird 60 min bei 100 000 g zentrifugiert. Der Niederschlag wird nochmals mit der halben Menge SDS-Puffer extrahiert und erneut zentrifugiert. Die lösliche Fraktion wird verworfen. Der unlösliche Niederschlag wird mit 300 ml NaCl-SDS-Puffer (2 % SDS, 10 % Glycerin, 0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8) 60 min bei 30°C gerührt. Anschließend wird 60 min bei 100 000 g und 25°C zentrifugiert. Das Pellet wird zweimal bei 4°C mit H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen. Die unlösliche Fraktion enthält hauptsächlich die Proteine F und H<sub>2</sub> und kleine Mengen an Protein I.

1 mg der äußeren Membranproteine werden in 1 ml 20 % Ameisensäure/6 M Harnstoff gelöst und an TSK 3000 (LKB) in Portionen zu 150 µl in 20 % Ameisensäure chromatographiert (Flußrate 1 ml/min). Das unter diesen Bedingungen in den Proteinfractionen erhaltene Material wird gepoolt und zeigt in der SDS-Gelelektrophorese eine einheitliche Bande, die im Molekulargewicht OMPF entspricht.

Dieses Material wird gefriergetrocknet, in 200 µl 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) aufgenommen und mit 20 µg (mit L-1-Tosylamid-2-phenylethyl-chlormethylketon behandeltem) Trypsin-TPCK (Cooper Biochemical GmbH) 18 Std. bei 37°C gespalten. Das Spaltgemisch wird mit Ameisensäure auf pH 3,5 gebracht und über "Reversed Phase"-Hochdruckflüssigkeitschromatographie fraktioniert.

**Chromatographiebedingungen:**

Säule: Vydac TPRP-18 (10 µm), 250 x 4 mm (Chrompack)

**Lösungsmittelsystem:**

Lösungsmittel A: 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (Fluka, z. Sequenzanalyse) in Wasser  
Lösungsmittel B: 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure in Acetonitril (E. Merck, Lichrosolv)  
Gradient von 0 % B bis 70 % B in A in 70 min  
Flußrate: 1,5 ml/min  
Raumtemperatur

Die erhaltenen Peptidfragmente werden zum Teil durch Aminosäureanalyse und Sequenzanalyse charakterisiert. Einige der erhaltenen Peakfraktionen werden nach Rechromatographie an TSK 2000 in 0,1 % Trifluoressigsäure auf einem Gasphasensequencer (Applied Biosystems 470 A) analysiert. Die Phenylhydantoin-Aminosäurederivate werden mit Hilfe eines isokratischen HPLC-Systems (Lottspeich, J. Chromatography 326, 321-327, 1985) identifiziert.

**Beispiel 2:****Gewinnung und Charakterisierung der OMPF-DNA**

Konstruktion einer Genbank von *Pseudomonas aeruginosa*:

λ EMBL3-Arme werden nach Maniatis et al. (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Publications 1982) präpariert. *P. aeruginosa*-DNA wird aus einer 500 ml Kultur isoliert (Rodriguez and Tait, Recombinant DNA Techniques, Addison-Wesley, 1983). 20 x 10 µg DNA werden mit dem Restriktionsenzym Sau3A partiell gespalten und durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation (Maniatis et al., s.o.) fraktioniert. Fragmente mit einer Größe von 15-20 kb werden mit λ EMBL3-Armen ligiert (Maniatis et al., s.o.). Diese ligierte DNA wird in Phagenpartikel (Amersham) verpackt. Pro µg DNA werden 2 x 10<sup>6</sup> rekombinante Phagen erhalten.

"Screenen" der Genbank nach OMPF-Sequenzen:

Rekombinante Phagen werden mit einer Dichte von 500 pfu auf einem NM539-Bakterienrasen ausplattiert. Phagenplaques werden nach der Methode von Benton und Davies (Science 196, 180-182, 1977) auf Nylon-Membranen übertragen. Durch Hybridisierung mit den Oligonucleotiden

AAC TC TTA GGCC TGAC TTTC TATGAA 3' und  
5' TCNGCA GTTC TTTCATA GAA 3', welche nach  
den Peptidsequenzen NLADFMK und NMKNAD  
synthetisiert wurden, werden aus 2500 rekombina-  
nten Phagenplaques 6 positive Kandidaten isoliert.

Sequenzanalyse des OMPF-Gens und seiner  
flankierenden Bereiche:

Von einem der isolierten Phagen wird eine Großkul-  
tur (1l) gezüchtet und daraus DNA präpariert  
(Maniatis et al., s.o.). Diese wird mit den Restrik-  
tionsenzymen Sall und Sau3A (partiell) gespalten.  
Die erhaltenen Restriktionsfragmente werden  
"shotgun" in pUC18 und pUC19 (Yanisch-Perron et  
al., Gene 33, 103-119, 1985) subkloniert. Aus hybri-  
disierungspositiven Klonen wird Plasmid-DNA iso-  
liert und diese nach weiterer Subklonierung, bzw.  
Exo III- und Exo VII-Verdauung (Yanisch-Perron et  
al., s.o.), nach der Methode von Chen und Seeburg  
(DNA 4, 165-170, 1985) sequenziert.

### Beispiel 3:

#### Expression von OMPF

Da die Expression von OMPF in *E. coli* toxisch  
für die Bakterien ist, sofern das Strukturgen auf  
einem "medium copy"- (pBR322) oder "high  
copy"- (pUC-Plasmid) Vektor unter der Kontrolle  
des eigenen Promotors vorliegt, wird das Struktur-  
gen zunächst unter die Kontrolle eines induzierba-  
ren Promotors gebracht. Ein Teilfragment des  
OMPF-Gens, welches den Promotor und den 5'-  
terminalen Teil des Strukturgens enthält, wird als  
Sall-Restriktionsfragment in Sall-geschnittene  
M13mp19 doppelsträngige DNA (Yanisch-Perron,  
s.o.) ligiert, und damit nach Standardbedingungen  
(Hanahan, J. Mol. Biol. 166, 557-580, 1983) *E. coli*  
JM109 (Yanisch-Perron et al., s.o.) transformiert.  
Aus einer 5 ml Flüssigkultur transformierter Bakte-  
rien werden aus dem Überstand Phagen gewonnen  
und daraus wird einzelsträngige DNA präpariert.  
Nach der Methode von Newman et al. (Cell 42,  
335-344, 1985) wird mit Hilfe eines Oligodesoxy-  
nucleotids eine gezielte Mutagenese an dieser ein-  
zelsträngigen DNA durchgeführt, um direkt vor  
dem ATG-Translationsinitiationscodon eine EcoRI-  
Restriktionsschnittstelle einzuführen, d.h. die  
Sequenz ATTTAACGGATG (Nucleotide 55-66 in  
Tabelle 1) wird in die Sequenz ATTGAATTCATG  
umgewandelt. Aus diesem neuen Konstrukt wird  
nun der 5'-terminale Teil des Strukturgens  
herausgeschnitten und unter die Kontrolle des in-  
duzierbaren tac-Promotors (de Boer et al., Proc.  
Natl. Acad. Sci. USA 78, 21 ff, 1983) gebracht. Zu  
diesem Zweck wird das EcoRI-Sall-Fragment in die

EcoRI- und Sall-Schnittstellen des Vektors pKK223-  
3 (Pharmacia) ligiert. Dieses klonierte Zwi-  
schenprodukt wird mit Sall und PstI geschnitten  
und in diese Schnittstellen wird der restliche Teil  
des OMPF-Strukturgens inklusive Terminatorregion  
als Sall-PstI-Fragment eingebracht. Das OMPF-  
Strukturgen steht nun unter der Kontrolle des indu-  
zierbaren tac-Promotors. Durch Zugabe von IPTG  
(Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid) zu der Kultur trans-  
formierter Zellen (JM109, Yanisch-Perron et al.,  
s.o.), wird der tac-Promotor dereprimiert und damit  
die Expression von OMPF induziert.

### Beispiel 4:

#### Herstellung von Antiseren

Gesunde Erwachsene, die in ihrer  
Krankheitsgeschichte keine Allergien, Diabetes,  
Immundefizienz-Krankheiten, Anämien oder Haut-  
krankheiten aufweisen, werden mit heterolog expri-  
miertem OMPF, bzw. Teilsequenzen davon, immu-  
nisiert. Die Vaccinierung erfolgt an den Tagen 1, 8,  
und 15. Drei Wochen nach der letzten Injektion  
wird den freiwilligen Kandidaten Blut entnommen  
und dieses auf Hepatitis B-Oberflächenantigenen  
sowie auf HIV-Antigene getestet. Nur negativ rea-  
gierende Plasmaspenden werden gepoolt, unter  
kontrollierten sterilen Bedingungen fraktioniert und  
abgepackt.

### Beispiel 5:

#### Herstellung von monoklonalen Antikörpern

Gereinigtes OMPF, bzw. OMPF-Teilpeptide  
davon, werden in Freund's Adjuvans oder Al(OH)<sub>3</sub>  
Balb/c-Mäusen intraperitoneal injiziert. Nach 6 Wo-  
chen wird mit gelöstem Antigen "geboostet". Der  
Antikörpertiter wird eine Woche später durch  
ELISA-Tests bestimmt. Bei unzureichender Immun-  
reaktion erfolgen weitere Injektionen. 3 Tage vor  
der Zellfusion werden die Mäuse mit 10  $\mu$ g des  
gelösten Antigens intravenös "geboostet".  
Die Milzzellen werden nach Standardmethoden  
(nach Köhler und Milstein) mit NS1-Zellen fusio-  
niert. Nach Selektion in HAT-Medium wachsen in  
den Mikronäpfen einzelne Kolonien aus, deren Kul-  
turüberstände wiederum im ELISA auf Antikörper  
gegen OMPF getestet werden. Positive Kolonien  
werden subkloniert.

Die Antikörper werden aus Kulturüberständen und aus in Balb/c-Mäusen induzierten Asciten gewonnen, nach gängigen biochemischen Methoden gereinigt und charakterisiert.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

5

Tabelle

GCCACCCAAGTTGTGCGGTGATTGTTGGACAACCTAAGTACCATCAAGATGGGGATTAA  
 CGGATGAAACTGAAGAACACCTTAGGCGTTGTCATCGGCTCGCTGGTTGCCGCTTCGGCA  
 N K L K N T L G V V I G S L V A A S A  
 ATGAACGCCTTCGCCCAGGGCCAGAAGTTCGGTAGAGATCGAAGCCTTCGGCAAGCGCTAC  
 N N A F A Q G Q N S V E I E A F G K R Y  
 TTCACCGACAGCGTTTCGCAACATGAAGAACGCTGACCTGTACGGCGGCTCGATCGGCTAC  
 F T D S V R N M K N A D L Y G G S I G Y  
 TTCCTGACCGACGACGTCGAGCTGGCTCTGTCTACGGTGAGTACCACGATGTTCTGTGGC  
 F L T D D V E L A L S Y G E Y H D V R G  
 ACCTACGAAACCGGCAACAAGAAGGTCCATGGCAACCTGACCTCCCTGGACGCCATCTAC  
 T Y E T G N K K V H G N L T S L D A I Y  
 CACTTCGGTACCCCGGGCGTAGGTCTGCGTCCGTACGTGTGCGCTGGTCTGGCTCACCAG  
 H F G T P G V G L R P Y V S A G L A H Q  
 AACATCACCAACATCAACAGCGACAGCCAAGGCCGTCAGCAGATGACCATGGCCAACATC  
 N I T N I N S D S Q G R Q Q M T M A N I  
 GGCGCTGGTCTGAAGTACTACTTACCGAGAAGTCTTCGCGCAAGGCCAGCCTCGACGGC  
 G A G L K Y Y F T E N F F A K A S L D G  
 CAGTACGGCCTGGAGAAGCGTGACAACGGTCACCAGGGTGAGTGGATGGCTGGCCTGGGC  
 Q Y G L E K R D N G H Q G E W M A G L G  
 GTCGGCTTCAACTTCGGTGGTTCGAAAGCCGCTCCGGCTCCGGAACCGGTTGCCGACGTT  
 V G F N F G G S K A A P A P E P V A D V  
 TGCTCCGACTCCGACAACGACGGCGTCTGCGACAACGTCGACAAGTGCCCGGACACCCCG  
 C S D S D N D G V C D N V D K C P D T P  
 GCCAACGTCACCGTTGACGCCAACGGCTGCCCGGCTGTGCGCGAAGTCGTACGCGTACAG  
 A N V T V D A N G C P A V A E V V R V Q  
 CTGGACGTGAAGTTGCACTTCGACAAGTCCAAGGTCAAAGAGAACAGCTACGCTGACATC  
 L D V K F D F D K S K V K E N S Y A D I  
 AAGAACCTGGCCGACTTCATGAAGCAGTACCCGCTCCACTTCCACCACCGTTGAAGGTCAT  
 K N L A D F M K Q Y P S T S T T V E G H  
 ACCGACTCCGTCGGTACCGACGCTTACAACCAGAAGCTGTCCGAGCGTCGTGCCAACGCC  
 T D S V G T D A Y N Q K L S E R R A N A  
 GTTCGTGACGTACTGGTCAACGAGTACGGTGTGGAAGGTGGTTCGCGTGAACGCTGTCCGT  
 V R D V L V N E Y G V E G G R V N A V G  
 TACGGCGAGTCCCGCCCGGTTGCCGACAACGCCACCGGTGAAGGCCGCGCTATCAACCGT  
 Y G E S R P V A D N A T A E G R A I N R  
 CGCGTTGAAGCCGAAGTAGAAGCCGAAGCCAAGTAATCGGCTGAGCCTTCAAAGAAAAAC  
 R V E A E V E A E A K \*  
 CGGCCCAGGCCGGGTTTTTCTTTGCCTGGAAAAAGACCGCTCGTCAGGCGCTCAGGGAAA  
 CCGGTTGCGACACGATGCCGCGGGCCACTTCGCCGATCTGGGTGACCTGCAG

## Ansprüche

1. Äußeres Membranprotein F (OMPF) vom *Pseudomonas aeruginosa* mit der Aminosäuresequenz gemäß Tabelle. 5
2. Immunogene Teilsequenzen des in Anspruch 1 definierten OMPF. 10
3. DNA, kodierend für OMPF, mit der DNA-Sequenz (codierender Strang) gemäß Tabelle.
4. Vektoren und DNA-Strukturen, die die DNA nach Anspruch 3 oder Teile davon enthalten.
5. Pro- oder eukaryotische Zellen, die Vektoren oder DNA-Strukturen nach Anspruch 4 enthalten. 15
6. Polyklonale und monoklonale Antikörper sowie die entsprechenden Seren, erhalten unter Verwendung von OMPF gemäß Anspruch 1 und immunogener Teilsequenzen dieses Proteins als Antigen. 20
7. Diagnostikum, enthaltend Antikörper nach Anspruch 6.
8. Diagnostikum, das die Nukleotidsequenz gemäß Anspruch 3 ganz oder teilweise oder eine davon abgeleitete Nukleotidsequenz enthält. 25
9. Diagnostizierverfahren unter Verwendung eines Diagnostikums nach Anspruch 7 oder 8.
10. Verwendung eines Proteins nach Anspruch 1 oder 2 zur Induzierung von Lymphozyten zur Produktion von Antikörpern. 30
11. Verwendung eines Proteins nach Anspruch 1 oder 2 zum Testen von Lymphozyten auf die Produktion von Antikörpern gegen solche Proteine. 35

Patentansprüche für den folgenden Vertragsstaat :  
ES

1. Verfahren zur Expression des äußeren Membranproteins F (OMPF) oder immunogener Teile davon, dadurch gekennzeichnet, daß die gemäß Tabelle für OMPF kodierende cDNA in geeignete Vektoren gebracht wird, damit pro-oder eukaryotische Zellen transformiert werden und die cDNA in diesen Transformanten exprimiert wird. 40
2. Verfahren zur Herstellung polyklonaler oder monoklonaler Antikörper gegen OMPF, dadurch gekennzeichnet, daß OMPF oder immunogene Teile davon zur Immunisierung eingesetzt werden. 45
3. Verfahren zur Herstellung von Diagnostika, dadurch gekennzeichnet, daß nach Anspruch 2 hergestellte Antikörper eingesetzt werden. 50
4. Verfahren zur Herstellung von Diagnostika, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleotidsequenz gemäß Tabelle oder Teile davon eingesetzt wird. 55

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



19



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

11 Veröffentlichungsnummer:

**0 297 291  
A3**

12

# EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 88108609.4

51 Int. Cl.4: **C12N 15/00 , A61K 39/104 ,  
C12Q 1/68 , G01N 33/577**

22 Anmeldetag: 30.05.88

30 Priorität: 03.06.87 DE 3718591

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
04.01.89 Patentblatt 89/01

64 Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB IT LI LU NL SE

68 Veröffentlichungstag des später veröffentlichten  
Recherchenberichts: 29.03.89 Patentblatt 89/13

71 Anmelder: **BEHRINGWERKE  
Aktiengesellschaft  
Postfach 1140  
D-3550 Marburg 1(DE)**

72 Erfinder: **Domdey, Horst, Dr.  
Fasanenweg 6  
D-8027 Neuried(DE)  
Erfinder: Lottspeich, Friedrich, Dr.  
Drosselweg 1  
D-8027 Neuried(DE)  
Erfinder: von Specht, Bernd-Ulrich, Prof. Dr.  
Am Waldweg  
D-8193 Ambach(DE)  
Erfinder: Duchene, Michael, Dr.  
Gabelsbergerstrasse 59  
D-8000 München 2(DE)**

74 Vertreter: **Meyer-Dulheuer, Karl-Hermann, Dr.  
et al  
HOECHST Aktiengesellschaft Zentrale  
Patentabteilung Postfach 80 03 20  
D-6230 Frankfurt/Main 80(DE)**

54 **Äusseres Membranprotein F von Pseudomonas aeruginosa.**

57 Das Gen für das äussere Membranprotein F (OMPF) von Pseudomonas aeruginosa wurde isoliert, sequenziert und exprimiert. Dadurch wird OMPF und immunogene Teilsequenzen in der Menge und Reinheit gewonnen, die für einen Einsatz zur Herstellung Impfstoffen erforderlich ist.

**EP 0 297 291 A3**



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE																	
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)														
D,X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 105, Nr. 15, 13. Oktober 1986, Seite 212, Ref.Nr. 128784n; Columbus, Ohio, US W.A. WOODRUFF et al.: "Expression in Escherichia coli and function of Pseudomonas aeruginosa outer membrane porin protein F." & J. BACTERIOL. 1986, 167(2), 473-9 * Zusammenfassung *	1-5, 8, 9	C 12 N 15/00 A 61 K 39/104 C 12 Q 1/68 G 01 N 33/577														
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 107, Nr. 7, 17. August 1987, Seite 566, Ref. Nr. 57059h; Columbus, Ohio, US; J.M. MATTHEWS-GREER et al.: "Outer membrane protein F (porin) preparation of Pseudomonas aeruginosa as a protective vaccine against heterologous immunotype strains in a burned mouse model" & J. INFECT. DIS. 1987, 155(6), 1282-91 * Zusammenfassung *	1, 2, 10, 11	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4) C 12 N A 61 K														
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS/RRM, Ref.Nr. 27016703; Philadelphia, US; P.A. SOKOL et al.: "Cloning and expression of the Pseudomonas aeruginosa porin gene in Escherichia coli" & ABSTR. ANN. MEET. AM. SOC. MICROBIOL. (USA) 1984, 84(O), Abstr. D72 * Zusammenfassung *	1-5, 8, 9															
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.																	
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 07-12-1988	Prüfer SKELLY														
<table border="0"><tr><td>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</td><td>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</td></tr><tr><td>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet</td><td>D : in der Anmeldung angeführtes Dokument</td></tr><tr><td>Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie</td><td>L : aus andern Gründen angeführtes Dokument</td></tr><tr><td>A : technol. gischer Hintergrund</td><td></td></tr><tr><td>O : nichtschriftliche Offenbarung</td><td></td></tr><tr><td>P : Zwischenliteratur</td><td></td></tr><tr><td>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</td><td>&amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</td></tr></table>				KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN	E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist	X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet	D : in der Anmeldung angeführtes Dokument	Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	L : aus andern Gründen angeführtes Dokument	A : technol. gischer Hintergrund		O : nichtschriftliche Offenbarung		P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN	E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist																
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet	D : in der Anmeldung angeführtes Dokument																
Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	L : aus andern Gründen angeführtes Dokument																
A : technol. gischer Hintergrund																	
O : nichtschriftliche Offenbarung																	
P : Zwischenliteratur																	
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument																



## GEBÜHRENPFLICHTIGE PATENTANSPRÜCHE

Die vorliegende europäische Patentanmeldung enthielt bei ihrer Einreichung mehr als zehn Patentansprüche.

- ☐ Alle Anspruchsgebühren wurden innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.
- ☐ Nur ein Teil der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn sowie für jene Patentansprüche erstellt für die Anspruchsgebühren entrichtet wurden.
- nämlich Patentansprüche:
- ☐ Keine der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn Patentansprüche erstellt.

## X MANGELNDE EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung; sie enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

1. Patentansprüche 1-5, 8, 10, 11 und 9 teilweise:  
DNS kodierende für OMPF von *Pseudomonas aeruginosa*, und ihre Verwendung als Diagnostika oder Vakzin
2. Patentansprüche 6, 7 und 9 teilweise:  
Polyklonale und monoklonale Antikörper gegen OMPF

- ☒ Alle weiteren Recherchegebühren wurden innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.
- ☐ Nur ein Teil der weiteren Recherchegebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf Erfindungen beziehen, für die Recherchegebühren entrichtet worden sind.
- nämlich Patentansprüche:
- ☐ Keine der weiteren Recherchegebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf die zuerst in den Patentansprüchen erwähnte Erfindung beziehen.
- nämlich Patentansprüche:



EP 88 10 8609

- 2 -

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
X	INFECTION AND IMMUNITY, Band 44, Nr. 1, April 1984, Seiten 49-54; Am. Soc. for Microbiology, US; H.E. GILLELAND Jr. et al.: "Use of a purified outer membrane protein F (porin) preparation of Pseudomonas aeruginosa as a protective vaccine in mice"  * Insgesamt *	1,2, 10,11	
P,X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 108, Nr. 25, 20. Juni 1988, Seite 143, Ref. Nr. 217037a; Columbus, Ohio, US; M. DUCHENE et al.: "Sequence and transcriptional start site of the Pseudomonas aeruginosa outer membrane porin protein F gene" & J. BACTERIOL. 1988, 170(1), 155-62  * Zusammenfassung *	1-5,8- 11	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)
P,X	INFECTION AND IMMUNITY, Band 56, Nr. 5, May 1988, Seiten 1017-1022; Am. Soc. for Microbiology, Washington, US; H.E. GILLELAND Jr. et al.: "Outer membrane protein F preparation of Pseudomonas aeruginosa as a vaccine against chronic pulmonary infection with heterologous immunotype strains in a rat model"  * Insgesamt *	1,2, 10,11	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort		Abschlußdatum der Recherche	
Prüfer			
<b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</b> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			

EPA Form 1503 03 82



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE																	
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)														
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 103, Nr. 9, 2. September 1985, Seite 493, Ref. Nr. 69460n; Columbus, Ohio, US; R.E.W. HANCOCK et al.: "Immunothe- rapeutic potential of monoclonal antibodies against Pseudomonas Aeruginosa protein F" & EUR. J. CLIN. MICROBIOL. 1985, 4(2), 224-7  * Zusammenfassung * --	6,7,9															
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 103, Nr. 1 8. Juli 1985, Seite 433, Ref.Nr. 4711a; Columbus, Ohio, US; L.M. MUTHARIA et al.: "Characteri- zation of two surface-localized antigenic sites on porin protein F of Pseudomonas aeruginosa" & CAN. J. MICROBIOL. 1985, 31(4), 381-6  * Zusammenfassung * --	6,7,9	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4)														
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 101, Nr. 25, 17. Dezember 1984, Seite 586, Ref.Nr. 228262b; Columbus, Ohio, US S. SAWADA et al.: "Protection against infection with Pseudomonas aeruginosa by passive transfer of monoclonal antibodies to lipopoly- saccharides and outer membrane proteins" & J. INFECT. DIS. 1984, 150(4), 570-6  * Zusammenfassung * --  ./...	6,7,9															
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.																	
Recherchenort		Abschlußdatum der Recherche	Prüfer														
<table border="0"><tr><td>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</td><td>E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</td></tr><tr><td>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet</td><td>D : in der Anmeldung angeführtes Dokument</td></tr><tr><td>Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie</td><td>L : aus andern Gründen angeführtes Dokument</td></tr><tr><td>A : technologischer Hintergrund</td><td></td></tr><tr><td>O : mündliche Offenbarung</td><td></td></tr><tr><td>P : Zwischenliteratur</td><td></td></tr><tr><td>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</td><td>&amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</td></tr></table>				KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN	E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist	X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet	D : in der Anmeldung angeführtes Dokument	Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	L : aus andern Gründen angeführtes Dokument	A : technologischer Hintergrund		O : mündliche Offenbarung		P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN	E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist																
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet	D : in der Anmeldung angeführtes Dokument																
Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	L : aus andern Gründen angeführtes Dokument																
A : technologischer Hintergrund																	
O : mündliche Offenbarung																	
P : Zwischenliteratur																	
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument																



EP 88 10 8609

- 4 -

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
X	INFECTION AND IMMUNITY, Band 54, Nr. 1, Oktober 1986, Seiten 239-244; Am. Soc. for Microbiology, US; J.E. PENNINGTON et al.: "Polyclonal and monoclonal antibody therapy for experimental Pseudomonas aeruginosa pneumonia"  * Insgesamt *  --	6,7,9	
X	INFECTION AND IMMUNITY, Band 42, Nr. 3, Dezember 1983, Seiten 1027-1033; Am. Soc. for Microbiology, US; L.M. MUTHARIA et al.: "Surface localization of Pseudomonas aeruginosa outer membrane porin protein F by using monoclonal antibodies"  * Insgesamt *  --	6,7,9	
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS/RRM, Ref.Nr. 25071807; Philadelphia, US; D.R. COOK et al.: "Detection of Pseudomonas aeruginosa antigen in serum using a PAN reactive monoclonal antibody" & CLIN. INVEST. MED. 1982, 5(2-3), 31B  * Zusammenfassung *  -----	6,7,9	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort		Abschlußdatum der Recherche	Prüfer
<p>EPA Form 1503 03 82</p> <p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</p> <p>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument</p> <p>&amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			